

Caracterização Molecular de Milho e Sorgo para Aplicação nos Programas de Melhoramento da Embrapa

Sílvia Neto Jardim Belicuas¹

Claudia Teixeira Guimarães²

Jurandir Vieira Magalhães³

A variabilidade genética é um dos mais importantes recursos na natureza e sua disponibilidade, emprego e conservação são estratégicos para a agricultura. O milho e o sorgo são culturas empregadas em todo o mundo para alimentação humana e animal e para a produção de biocombustíveis, sendo espécies de enorme importância econômica.

O profundo conhecimento do material elite de um programa de melhoramento é indispensável para sua exploração sistemática, tornando possível o desenvolvimento de novas linhagens e híbridos. O conhecimento desse material pode ser empregado para atribuição do mesmo em grupos heteróticos, escolha de testadores para ensaios de combinações híbridas e para a geração de híbridos (WENZEL, 2006).

Um dos maiores desafios da biotecnologia na agricultura tem sido acelerar etapas dentro do programa de melhoramento. Para isso, os marcadores moleculares podem ser empregados, pois permitem uma ampla

amostragem do genoma. Têm sido empregados para a seleção assistida (ABALO et al., 2009) *fingerprintings* com fins de investigação de pureza e proteção de cultivares (WARBURTON et al., 2002) e avaliação de diversidade (KLEIN et al., 2008; LU et al., 2009). A genotipagem das linhagens elite permite, além da proteção de cultivares, o direcionamento dos cruzamentos entre linhagens geneticamente distantes, favorecendo a obtenção de híbridos mais vigorosos e de alta produtividade. Quando as informações genotípicas e fenotípicas de linhagens-elite encontram-se adequadamente integradas, é possível que o melhorista selecione parentais que, ao serem cruzados, gerem populações enriquecidas para combinações desejáveis de alelos favoráveis (GUIMARÃES et al., 2009).

Os marcadores microssatélites oferecem vantagens em termos de confiabilidade, reprodutibilidade, discriminação, padronização e custo sobre outros tipos de marcadores

¹ Bióloga, doutora, Pesquisadora A - Embrapa Milho e Sorgo - silvia@cnpmc.embrapa.br

² Engenheira Agrônoma, doutora, Pesquisadora A - Embrapa Milho e Sorgo - claudia@cnpmc.embrapa.br

³ Engenheiro Agrônomo, doutor, Pesquisador A - Embrapa Milho e Sorgo - jurandir@cnpmc.embrapa.br

moleculares (SMITH et al., 1997; VARSHNEY et al., 2005). São formados por um a seis nucleotídeos repetidos de 10 a 60 vezes em tandem ao longo da molécula de DNA (RAFALSKI et al., 1996), flanqueados por regiões conservadas. Cada microssatélite constitui um loco genético altamente variável, multialélico e com um elevado conteúdo informativo de polimorfismo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Possuem elevado poder discriminatório e, em geral, poucos locos permitem a completa diferenciação dos genótipos de interesse, característica relevante, considerando a necessidade de discriminação de cultivares muito próximas.

Com o objetivo de gerar um banco de dados de frequências alélicas e selecionar um conjunto de marcadores com alta reprodutibilidade e informatividade para ser utilizado em processos de proteção de linhagens de milho e de pureza genética, foi realizada a caracterização com marcadores microssatélites de um painel contendo 57 linhagens-elite de milho e 55 de sorgo entre as empregadas com maior frequência nos cruzamentos para a obtenção de híbridos no programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo.

Oito sementes de cada linhagem, tanto de milho quanto de sorgo, foram plantadas em suporte de isopor contendo orifícios de 3 X 3 cm cada, preenchidos com terra adubada organicamente e mantidos em casa de vegetação. Esse número de sementes foi empregado para verificar a homogeneidade do material e assim assegurar que o DNA fosse extraído de linhagens puras. O DNA genômico foi extraído a partir de folhas jovens de pelo menos cinco plantas de cada linhagem, de acordo com o método descrito por Saghai-Maroo et al. (1984). O mesmo foi avaliado em gel de agarose corado com brometo de etídio para verificar sua integridade e concentração.

A partir de dados publicados anteriormente por Padilha (2002) em seu trabalho de caracterização de linhagens de milho, foram selecionados 21 marcadores microssatélites de milho informativos, levando em consideração o seu polimorfismo, distribuição ao longo do

genoma, pela frequência dos alelos e valor do Conteúdo de Informação do Polimorfismo (PIC). As reações de amplificação foram previamente padronizadas para serem realizadas em multiplex, ou seja, um grupo de reações realizadas simultaneamente com cada amostra, minimizando assim o dispêndio de tempo e reagentes. Os 21 marcadores selecionados foram organizados de modo a formar sete tripletes (Tabela 1). Tais conjuntos de tripletes foram testados em quatro linhagens-elite de milho quanto à amplificação de fragmentos detectados satisfatoriamente pelo equipamento ABI377. Após vários ajustes na concentração dos reagentes e na temperatura de anelamento, foi estabelecido um protocolo de amplificação satisfatória para todos os conjuntos multiplex, que poderá ser empregado em qualquer DNA genômico de milho, descrito a seguir. As reações de amplificação em multiplex foram preparadas com volume final de 20 µL, consistindo de 30 ng de DNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5mM de MgCl₂, 0,5U Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,25 mM dNTPs e 2,5 pM de cada um dos pares de iniciadores componentes da reação multiplex. As amplificações seguiram-se mediante as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos, 30 ciclos de 95°C por um minuto, 55°C por dois minutos e 72°C por dois minutos, elongação final a 72°C por cinco minutos. A reação de amplificação foi diluída duas vezes em água destilada e 3 µL dessa diluição foram misturados a 0,3 µL do padrão GS-500 ROX (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0,8 µL de formamida HI-DI (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 0,4 µL de tampão de carregamento (*blue dextran* 50mg/ml; EDTA 25 mM). As amostras foram desnaturadas por dois minutos a 95°C e mantidas em gelo até o carregamento de 3 µL em gel de poliacrilamida 5% (p/v) (Long Ranger Gel Solution, Cambrex); ureia 6 M; Tris 100 mM; ácido bórico 100 mM e EDTA 2 mM. A eletroforese foi realizada no sequenciador automático de DNA ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA), por 2,5 h a 3000V em tampão TBE (Tris-HCl 0,89M; ácido bórico 0,02M e EDTA 0,02M pH 8,0). Estes conjuntos multiplex vão permitir um ganho de

tempo e emprego de um número menor de reagentes na análise por marcadores moleculares de genótipos de milho, facilitando o trabalho em larga escala na genotipagem de milho.

A genotipagem de 55 linhagens de sorgo foi realizada com 15 marcadores microssatélites (Tabela 2), conforme descrito por Smith et al. (2000). Cada uma das reações de amplificação em multiplex foi preparada para um volume final de 20 µL, consistindo de 30 ng de DNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5mM de MgCl₂, 0,5U Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,25 mM dNTP e 2,5 pM de cada um dos 5 pares de iniciadores componentes da reação multiplex. As amplificações seguiram-se mediante as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por quatro minutos, 25 ciclos de

95°C por um minuto, 55°C por dois minutos e 72°C por dois minutos, e elongação final a 72°C por dez minutos. Um volume de 2 µL do produto da reação de PCR diluído três vezes em água destilada foi misturado a 0,2 µL do padrão GS-500 ROX (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1 µL de formamida HI-DI (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 0,5 µL de tampão de carregamento (*blue dextran* 50mg/ml; EDTA 25 mM). As amostras foram desnaturadas por cinco minutos a 95°C e mantidas em gelo até o carregamento de 2 µL em gel de poliacrilamida 5% (p/v) (Long Ranger Gel Solution, Cambrex); ureia 6 M; Tris 100 mM; ácido bórico 100 mM e EDTA 2 mM. A eletroforese foi realizada no sequenciador automático de DNA ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA), por 2,5 h a 3000V em tampão TBE (Tris-HCl 0,89M; ácido bórico 0,02M e EDTA 0,02M pH 8,0).

Tabela 1: Conjuntos multiplex padronizados para amplificação de microssatélites de milho

Microssatélite	Bin	Fluorescência	Multiplex
dupssr14	8.09	TET	1
umc1771	9.04	HEX	1
bnlg182	1.03	6-FAM	1
phi053	3.05	TET	2
umc1862	1.11	6-FAM	2
bnlg1863	8.03	HEX	2
phi084	10.04	TET	3
umc1653	6.07	HEX	3
bnlg589	4.10	6-FAM	3
phi116	7.06	6-FAM	4
dupssr24	2.08	TET	4
bnlg1006	5.00	HEX	4
bnlg2241	3.06	6-FAM	5
umc1019	5.06	TET	5
bnlg161	6.00	HEX	5
umc1084	10.07	TET	6
umc1033	9.02	6-FAM	6
bnlg125	2.02-2.03	HEX	6
umc1016	7.02	6-FAM	7
bnlg1338	2.01	TET	7
umc1008	4.01	HEX	7

Tabela 2: Conjuntos multiplex padronizados para amplificação de microssatélites de sorgo (segundo SMITH et al., 2000)

Microssatélite	Grupo Ligação	Fluorescência	Multiplex
Sb4-15	E	6-FAM	1
Sb4-121	D	6-FAM	1
Sb4-32	E	TET	1
Sb5-236	G	HEX	1
Sb6-342	A	HEX	1
Sb6-36	C	6-FAM	2
Sb1-1	H	6-FAM	2
Sb1-10	D	TET	2
Sb5-256	C	TET	2
Sb6-84	F	HEX	2
Sb6-42	-	6-FAM	3
Sb6-57	C	6-FAM	3
Sb6-34	I	TET	3
Sb5-206	E	TET	3
Sb4-72	B	HEX	3

Após a reação de amplificação, as bandas foram analisadas com o auxílio do programa computacional GeneScan e os tamanhos dos alelos foram determinados com o programa Genotyper (Applied Biosystems, Foster City, CA). A variação genética de cada loco foi medida em termos do número de alelos por loco e conteúdo de informação polimórfica, PIC, de acordo com a fórmula:

$PIC = 1 - \sum (p_i)^2$, sendo p_i a frequência de cada alelo dentro do loco.

Os produtos da amplificação dos 15 iniciadores

de sorgo analisados amostraram de maneira ampla o genoma do sorgo, gerando um total de 185 alelos para as 55 linhagens consideradas. Em sorgo, todos os 15 locos microssatélites avaliados foram polimórficos nas linhagens estudadas. O número de alelos por loco variou de dois (Sb5-256) a 18 (Sb5-206), indicando ampla diversidade genética entre os genótipos avaliados. Os valores de PIC fornecem uma estimativa da força discriminatória do loco, pois, além do número de alelos, é levada em consideração também a frequência relativa dos alelos. Os valores de PIC para os 15 locos microssatélites de sorgo variaram de 0.49 (Sb5-256) a 0.89 (Sb6-57 e Sb4-32) (Tabela 3), com PIC médio de 0,76.

Tabela 3: Características dos 15 locos microssatélites avaliados em linhagens de sorgo

Loco	Número de Alelos	Faixa Alélica (pares de bases)	PIC
sb4-15	8	116-132	0,74
sb4-121	9	211-226	0,86
sb5-236	12	166-198	0,81
sb4-72	10	168-188	0,71
sb5-206	18	109-147	0,76
sb6-34	11	178-202	0,74
sb6-57	15	276-309	0,89
sb6-42	13	164-232	0,85
sb5-256	2	167-169	0,49
sb6-84	17	170-202	0,83
sb1-10	15	208-308	0,78
sb1-1	16	144-260	0,58
sb6-342	9	265-292	0,63
sb4-32	16	164-194	0,89
sb6-36	14	161-193	0,84

Os 21 locos microssatélites avaliados em milho foram polimórficos nas linhagens estudadas, amplificando um total de 404 alelos. O número de alelos por loco variou de oito (umc1771 e phi116) a 36 (bnlg1006), indicando ampla variabilidade genética entre os genótipos avaliados. Os valores de PIC para os 21 locos microssatélites de milho variaram de 0.65 (bnlg589) a 0.96 (bnlg1006) (Tabela 4) com PIC médio de 0,85. Esse valor foi superior ao obtido

por Smith et al. (1997) que utilizaram 131 *primers* marcados com fluorescência em 58 linhagens e quatro híbridos de milho e encontraram valor médio de PIC igual a 0,62. É possível que tenha sido detectada uma maior diversidade genética entre as linhagens-elite da Embrapa Milho e Sorgo, pois neste trabalho foram empregados apenas os marcadores mais informativos, selecionados a partir do trabalho anterior de Padilha (2002).

Tabela 4: Características dos 21 locos microssatélites avaliados em linhagens de milho

Loco	Número de Alelos	Faixa Alélica (pares de bases)	PIC
bnlg1006	36	160-262	0,96
bnlg125	20	310-384	0,92
bnlg1338	20	88-236	0,88
bnlg161	26	82-212	0,92
bnlg182	16	78-404	0,88
bnlg1863	26	114-184	0,92
bnlg2241	14	96-266	0,86
dupssr14	18	70-176	0,79
dupssr24	29	92-152	0,94
phi084	17	82-192	0,88
umc1008	25	62-170	0,92
umc1016	26	92-174	0,93
umc1019	16	70-104	0,90
umc1033	26	84-190	0,95
umc1084	13	104-154	0,68
umc1653	25	104-182	0,92
umc1771	8	110-152	0,68
umc1862	9	67-150	0,68
bnlg589	15	78-208	0,65
phi053	11	74-194	0,82
phi116	8	140-174	0,75

A caracterização de linhagens é essencial para um programa de melhoramento e os marcadores microssatélites foram eficientes para caracterizar e determinar a variabilidade das linhagens de milho e sorgo do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo. Devido ao alto índice de polimorfismo detectado, os conjuntos de marcadores empregados são indicados para a obtenção de *fingerprints* moleculares. As informações relacionadas com o padrão de amplificação dos alelos em cada linhagem e com os valores de frequências alélicas foram armazenadas em um banco de dados, de

fundamental importância para a implementação dos marcadores microssatélites, tanto para a caracterização molecular das linhagens-elite quanto para a avaliação da pureza genética de sementes. As informações moleculares podem ser utilizadas como uma ferramenta adicional pelo melhorista no sentido de explorar o máximo da variabilidade genética do seu material de trabalho.

Referências

- ABALO, G.; TONGOONA, P.; DERERA, J.; EDEMA, R. A. Comparative analysis of conventional and marker-assisted selection methods in breeding maize streak virus resistance in maize. **Crop Science**, Madison, v. 49, p. 509-520, 2009.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa-Cenargem, 1998. 220 p.
- GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I.; MAGALHAES, J. V.; SOUZA JÚNIOR, C. L. Marcadores moleculares no melhoramento. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2009. Cap. 4, p. 129-175.
- KLEIN, R. R.; MULLET, J. E.; JORDAN, D. R.; MILLER, F. R.; ROONEY, W. L.; MENZ, M. A.; FRANKS, C. D.; KLEIN, P. E. The Effect of tropical sorghum conversion and inbred development on genome diversity as revealed by high-resolution genotyping. **Crop Science**, Madison, v. 48, p. S12-S26, 2008.
- LU, Y.; YAN, J.; GUIMARÃES, C. T.; TABA, S.; HAO, Z.; GAO, S.; CHEN, S.; LI, J.; ZHANG, S.; VIVEK, B. S.; MAGOROKOSHO, C.; MUGO, S.; MAKUMBI, D.; PARENTONI, S. N.; SHAH, T.; RONG, T.; CROUCH, J. H.; XU, Y. Molecular characterization of global maize breeding germplasm based on genome-wide single nucleotide polymorphisms. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 120, p. 93-115, 2009.
- PADILHA, L. **Marcadores moleculares semi-automatizados na caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical**. 2002. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- RAFALSKI, D. J. A.; VOGEL, J. M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C.; TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B.; LAI, E. (Ed.). **Non mammalian genomic analysis: a practical guide**. New York: Academic Press, 1996. p. 75-134.
- SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. A.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of National Academy of Science**, Washington, v. 81, p. 8014-8018, 1984.
- SMITH, J. S. C.; CHIN, E. C. L.; SHU, H.; SMITH, O. S.; WALL, S. J.; SENIOR, M. L.; MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S.; ZIEGLE, J. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, p. 163-173, 1997.
- SMITH, J. S. C.; KRESOVICH, S.; HOPKINS, M. S.; MITCHELL, S. E.; DEAN, R. E.; WOODMAN, W. L.; LEE, M.; PORTER, K. Genetic diversity among elite sorghum inbred lines assessed with simple sequence repeats. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 226-232, 2000.
- VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, p. 48-55, 2005.
- WARBURTON, M. L.; XIANCHUN, X.; CROSSA, J.; JORGE FRANCO, J.; MELCHINGER, A. E.; FRISCH, M.; BOHN, M.; HOISINGTON, D. Genetic characterization of CIMMYT inbred maize lines and open pollinated populations using large scale fingerprinting methods. **Crop Science**, Madison, v. 42, p. 1832-1840, 2002.
- WENZEL, G. Molecular plant breeding: achievements in green biotechnology and future perspectives. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 70, p. 642-650, 2006.

Comunicado Técnico, 177

Ministério da Agricultura
Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Endereço: Rod. MG 424 Km 45 Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027 1100

Fax: (31) 3027 1188

E-mail: sac@cnpmc.embrapa.br

1a edição

1a impressão (2009): 200 exemplares

Comitê de Publicações

Presidente: Antônio Álvaro Corsetti Purcino

Secretário-Executivo: Flávia Cristina dos Santos

Membros: Elena Charlotte Landau, Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana e Clenio Araujo

Expediente

Revisão de texto: Clenio Araujo

Normalização Bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Editoração eletrônica: Communique Comunicação